

P 1342



18 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 101 00 053 A 1

51 Int. Cl.7:  
A 61 K 38/05  
A 61 K 31/198

21 Aktenzeichen: 101 00 053.7  
22 Anmeldetag: 2. 1. 2001  
43 Offenlegungstag: 22. 8. 2002

(2)

DE 101 00 053 A 1

71 Anmelder:  
KeyNeurotek AG i.G., 39120 Magdeburg, DE;  
Ansorge, Siegfried, Prof. Dr., 39291 Hohenwarthe,  
DE  
  
74 Vertreter:  
Koepe & Partner Patentanwälte, 80538 München

72 Erfinder:  
Ansorge, Siegfried, Prof. Dr., 39291 Hohenwarthe,  
DE; Lendeckel, Uwe, Dr., 39120 Magdeburg, DE;  
Striggow, Frank, Dr., 39120 Magdeburg, DE;  
Neubert, Klaus, Prof. Dr., 06120 Halle, DE;  
Reymann, Klaus, Prof. Dr., 39120 Magdeburg, DE;  
Kähne, Thilo, Dr., 39120 Magdeburg, DE

56 Entgegenhaltungen:  
WO 98 19 998 A2  
WO 93 07 872 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verwendung von Enzyminhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV sowie der Amino-peptidase N und pharmazeutischen Zubereitungen daraus zur Prävention und/oder Therapie Ischämie-bedingter akuter und chronischer neurodegenerativer Prozesse und Erkrankungen

57 Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren, bei dem durch die separate oder gemeinsame Verabreichung und Wirkung von Enzyminhibitoren der Alanyl-Amino-peptidase (APN) und der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) bzw. von Enzymen gleicher oder ähnlicher Substratspezifität, die Schädigung cerebralen Gewebes infolge einer Ischämie oder eines Schädel/Hirn Traumas vermindern oder vorbeugen läßt.  
Unsere Erfindung zeigt, daß zur Prävention und Therapie obiger Indikationen die separate oder kombinierte Applikation von Hemmstoffen oben genannter Enzyme bzw. entsprechender Zubereitungen und Darreichungsformen daraus geeignet sind.

DE 101 00 053 A 1

[0001] Die Erfindung beschreibt die Verminderung Ischämie-bedingter cerebraler Schädigungsprozesses durch die Hemmung der enzymatischen Aktivitäten von Amino-peptidase N (APN, EC 3.4.11.2, CD13) und/oder Dipeptidyl-peptidase IV (DP IV, EC 3.4.14.5, CD26) bzw. von Enzymen gleicher oder ähnlicher Substratspezifität. Ein neuroprotektiver Effekt wird sowohl durch eine kombinierte als auch die separate Applikation jeweils spezifischer Inhibitoren dieser Enzyme auf der Basis von Aminosäurederivaten, Peptiden oder Peptidderivaten erzielt.

[0002] Als Ischämie wird die Unterbrechung der Blutversorgung von Zellen, Geweben oder Organen bezeichnet. Diese Situation ist insbesondere dann kritisch, wenn eine kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff und/oder Nährstoffen (z. B. Glucose) notwendig ist. Dies gilt insbesondere für das zentrale Nervensystem (ZNS), da gerade Nervenzellen extrem empfindlich auf eine Unterbrechung der Sauerstoff und Glucoseversorgung reagieren. Bereits eine kurzzeitige Ischämie, z. B. infolge eines Schlaganfalls oder eines Herzinfarkts, führt zum neuronalen Zelltod in den betroffenen Hirnarealen. Cerebrale Ischämie ist in den modernen Industriestaaten die häufigste Ursache für Mortalität und Invalidität. So beträgt die jährliche Inzidenzrate des Schlaganfalls in Deutschland ca. 400/100.000 Einwohner.

[0003] Die zellulären Mechanismen Ischämie-bedingter Schädigungsprozesse sind vielschichtig und in ihrer Komplexität bisher nur ungenügend verstanden. Daher sind Maßnahmen zur Prävention und Therapie problematisch [Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends Neurosci 22: 391-399].

[0004] Es ist bekannt, daß im Prozess der Aktivierung und klonalen Expansion von Immunzellen, insbesondere von T-Lymphozyten, membranständige Peptidasen wie DP IV oder APN eine Schlüsselrolle spielen [Fleischer B: CD26a surface protease involved in T-cell activation. Immunology Today 1994; 15: 180-184; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells. International Journal of Molecular Medicine 1999; 4: 17-27; Riemann D et al.: CD 13 - not just a marker in leukemia typing. Immunology Today 1999; 20: 83-88]. Verschiedene Funktionen mitogen-stimulierter mononukleärer Zellen (MNZ) oder angereicherter T-Lymphozyten wie DNS-Synthese, Produktion und Sekretion von immunstimulierenden Zytokinen (IL-2, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ ) und Helferfunktionen für B-Zellen (IgG- und IgM-Synthese) können in Gegenwart von spezifischen Inhibitoren der DP IV und der APN gehemmt werden [Schön E et al.: The dipeptidyl peptidase IV, a membrane enzyme involved in the proliferation of T lymphocytes. Biomed. Biochim. Acta 1985; 2: K9-K15; Schön E et al.: The role of dipeptidyl peptidase IV in human T lymphocyte activation. Inhibitors and antibodies against dipeptidyl peptidase IV suppress lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis in vitro. Eur. J. Immunol. 1987; 17: 1821-1826; Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor  $\beta$  1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360; Lendeckel U et al.: Induction of the membrane alanyl aminopeptidase gene and surface expression in human T cells by mitogenic activation. Biochem. J. 1996; 319: 817-823; Kähne T et al.: Dipeptidyl peptidase IV: A cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (Review). Int. J. Mol. Med. 1999; 4: 3-15; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (Review). Int. J. Mol. Med. 1999; 4: 17-27].

[0005] Innerhalb des ZNS sind DP IV und APN auf verschiedenen Zelltypen und Arealen lokalisiert (siehe unten). Kürzlich konnte eine intrazellulär im Cytosol lokalisierte DP IV nachgewiesen werden [Gilmartin L und O'Cuinn G: Neurosci Res 1999; 34: 1-11]. Möglicherweise ist dieses Enzym identisch mit dem von uns erstmals in hippocampalen Pyramidenzellen markierten Protein (Abb. 1, Fluoreszenzaufnahme Hippocampus, I-63/Fluoreszein markiert). Insbesondere diese Nervenzellen sind für ihre herausragende Bedeutung für Lern- und Gedächtnisprozesse [Bliss TVP, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature 361: 31-39] sowie für ihre ausgesprochene Sensitivität gegenüber ischämischen Ereignissen bekannt [Striggow F, Riek M, Breder J, Henrich-Noack P, Reymann KG, Reiser G (2000) The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 97: 2264-2269].

[0006] Periphere Immunzellen, beispielsweise T-Zellen, sind normalerweise nicht im ZNS vorhanden. Sie können jedoch in pathologischen Situationen dahin eindringen, insbesondere dann, wenn die Blut/Hirnschranke durchlässig wird. Genau diese Situation ist bei einer cerebralen Ischämie gegeben [Fischer S, Clauss M, Wiesnet M, Renz D, Schaper W, Karliczek GF (1999) Hypoxia induces permeability in brain microvessel endothelial cells via VEGF and NO. Am J Physiol 276: C812-C820]. Die APN ist zudem eine wesentliche Komponente der Zellmembran von Perizyten. Speziell auf Perizyten bestimmen Expression und Aktivität der APN maßgeblich die Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke und Beeinträchtigungen der Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke gehen mit veränderter Expression der APN einher [Kunz J et al.: J Neurochem. 1994; 62: 2375-2386; Kunz J et al.: J Neuroimmunol. 1995; 59: 41-55; Ramsauer M et al.: J Cereb Blood Flow Metab 1998; 18: 1270-1281; Alliot F et al.: J Neuroscience Research 1999; 58: 367-378].

[0007] Sowohl die Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) als auch die Alanyl-Amino-peptidase (APN) werden in verschiedenen Arealen des Gehirns exprimiert. Lösliche und Membran-gebundene DP IV wurde im Rattenhirn nachgewiesen [Alba F et al.: Peptides 1995; 16: 325-329]. Ebenso konnte DP IV im Zytosol des Meerschweinchenhirns nachgewiesen werden [Gilmartin L und O'Cuinn G: Neurosci Res 1999; 34: 1-11]. Neben dem gut dokumentierten Vorkommen von DP IV auf dem Endothel von Mikrogefäßen des Hirns, wurde das Enzym auf Schwann-Zell-Membranen an deren Kontaktstellen zu Axonen sensorischer Nervenendigungen in verschiedenen Säugetieren [Dubovy P und Malinovsky L: Histochemical J 1984; 16: 473-475] sowie an der Luminalmembran von Ependymalzellen in den Ventrikeln und dem zentralen Kanal des Rückenmarks [Bourne et al.: Biochem J 1989; 259: 69-80] lokalisiert. DP IV wurde desweiteren eindeutig auf dem Endothel der Mikrovaskulatur des Schweinehirns nachgewiesen sowie dort auch auf Zellen des Striatums [Barnes K et al.: Eur J Neurosci 1994; 6: 531-537].

[0008] Die Expression von APN im ZNS erfolgt auf einer breiteren zellulären und räumlichen Basis. Die neuronalen Zelllinien H4 und SK-N-SH, die Oligodendrozyten-Linie MO3.13 sowie die Astrozytenlinien GL-15, U-87 MG und U-373 MG zeichnen sich durch Oberflächenexpression von APN aus [Lachance C et al.: J Virology 1998; 72: 6511-6519]. Diese APN-Oberflächenexpression ist offenbar für den Neurotropismus des humanen Coronavirus 229E verantwortlich

[Lachance C et al.: J Virology 1998; 72: 6511–6519]. Neben der Expression auf Gefäßendothel findet sich APN auf Astroglia-Zellen und Perizyten [Barnes K et al.: Eur J Neurosci 1994; 6: 531–537].

[0009] Vor dem Hintergrund, daß Inhibitoren der APN und der DP IV nachweislich die Produktion und Freisetzung des immunosuppressiven Zytokins "transforming growth factor- $\beta$ 1" (TGF- $\beta$ 1) aus Immunzellen bewirken [Reinhold D et al.: Immunology 1997; 91: 354–360; Lendeckel U et al. Int J Molecular Medicine 1999; 4: 17–27; Kähne T. et al.: Int J Molecular Medicine 1999; 4: 1–15] ist die Tatsache bemerkenswert, daß dem TGF- $\beta$ 1 offenbar große Bedeutung bei der Begrenzung von Schädigungen des ZNS zukommt. Diese eindeutig neuroprotektiven Funktionen des TGF- $\beta$ 1 könnten bei ischämischen oder exzitotoxischen Läsionen sowie nach Neurotrauma nachgewiesen werden [Ruocco A et al.: Cereb Blood Flow Metab 1999; 19: 1345–1353; Yamashita K et al.: Brain Res 1999; 836: 139–145; Docagne F et al.: FASEB J 1999; 13: 1315–1324; Morganti-Kossmann MC et al.: J Neurotrauma 1999; 16: 617–628; Ho TW et al.: Exp Neurol 2000; 161: 664–675; Henrich-Noack P et al.: Stroke 1996; 27: 1609–1615; Lehrmann E et al.: Exp Neurol 1995; 131: 114–123; Knuckey NW et al.: Brain Res Mol Brain Res 1996; 40: 1–14; Zhu Y et al.: Brain Res 2000; 866: 286–298]. TGF- $\beta$ 1 wird im gesamten Gehirn exprimiert; vergleichsweise höher am Ort von Schädigungen, wobei vorwiegend Astrozyten und Mikroglia-Zellen TGF- $\beta$ 1 produzieren und freisetzen [O'Keefe GM et al.: Eur J Immunol 1999; 29: 1275–1285; Docagne F et al.: FASEB J. 1999; 13: 1315–1324].

[0010] Der hier beschriebenen Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, daß die kombinierte und separate Wirkung von Enzyminhibitoren der DP IV (EC 3.4.14.5.) sowie der APN (EC 3.4.11.2) das Überleben neuronaler Zellen in kultivierten Hippocampuschnitten (präpariert aus juvenilen Rattenhirnen) nach Ischämie signifikant verbessert. Dies war bisher nicht bekannt. Unsere Erfindung zeigt daher, daß die kombinierte oder gleichzeitige Verabreichung oben genannter Inhibitoren bzw. entsprechender Zubereitungen und Darreichungsformen daraus zur Prävention und/oder Therapie Ischämie-induzierter cerebraler Schädigungsprozesse geeignet ist.

[0011] Bisherige Untersuchungen in unseren Labors zeigten, daß die DNS-Synthese und Proliferation humaner Immunzellen, beispielsweise von peripheren mononukleären Zellen (MNZ) oder T-Lymphozyten durch die simultane und separate Administration von Inhibitoren der DP IV (z. B. Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und der APN (z. B. Actinonin) gehemmt sowie die Bildung und Sekretion von Zytokinen verändert wird [Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor  $\beta$ 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354–360]. Ob ein antiproliferativer Effekt von DP IV- und APN-Inhibitoren auch der hier beschriebenen neuroprotektiven Wirkung beider Substanzklassen zugrunde liegt, verbleibt noch unklar, ist aber wahrscheinlich.

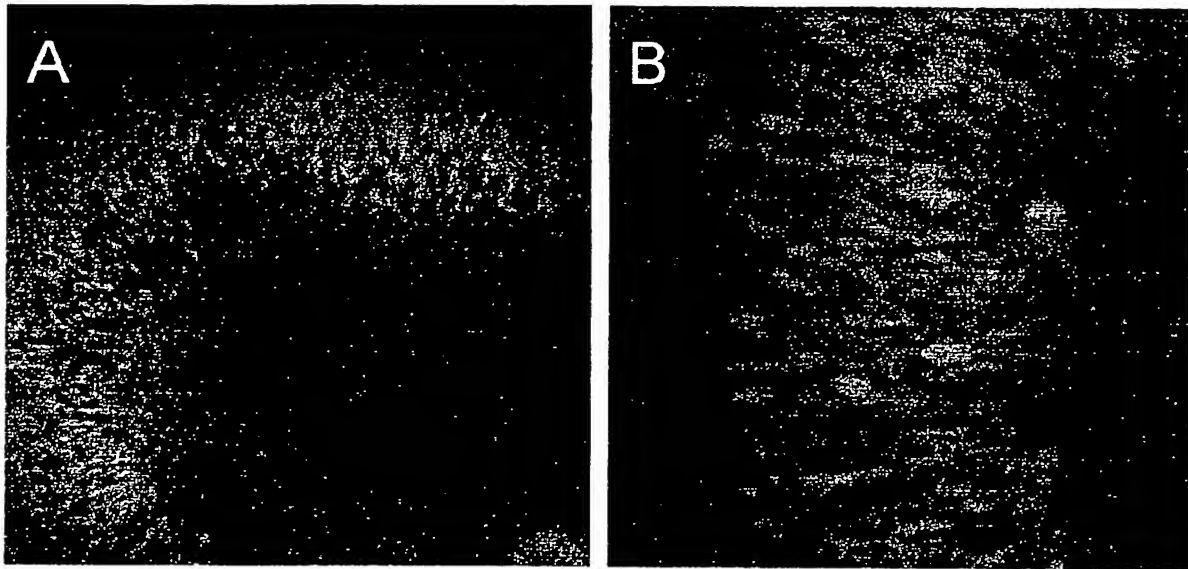
[0012] Die Applikation von Enzyminhibitoren der DP IV und/oder der APN stellt bei den genannten Erkrankungen eine neuartige Methode und ergänzende Therapieform dar. Die erfindungsgemäß applizierten Inhibitoren der DP IV und der APN können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, inhibitorisch wirkende Peptide und Peptidderivate sowie als Antikörper dieses Enzyms zur Anwendung kommen. Bevorzugte Effektoren sind beispielsweise für die DP IV Xaa-Pro-Dipeptide, entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)<sub>n</sub>-Peptide (n = 0–10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine  $\alpha$ -Aminosäure/Iminosäure bzw. ein  $\alpha$ -Aminosäurederivat/Iminosäurederivat, vorzugsweise N<sup>ε</sup>-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z. B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate. Derartige Verbindungen und deren Herstellung wurden in einem früheren Patent beschrieben (K. Neubert et al. DD 296075 A5). Bevorzugte Inhibitoren für die Alaninyl-Aminopeptidase sind Bestatin (Ubenimex), Actinonin, Probestin, Phebestin, RB3014 oder Leuhistin.

[0013] Die Inhibitoren werden simultan oder einzeln mit bekannten Trägerstoffen verabreicht. Die Verabreichung erfolgt einerseits als topische Applikation in Form von z. B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln einschließlich instilativer Applikation und andererseits als systemische Applikation zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären Anwendung in geeigneten Rezepturen bzw. in geeigneter Galenik.

## Neuronale Lokalisation von DP IV (oder eines DP IV-ähnlichen Enzyms) im Hippocampus

Abb. 1

Konfokale Fluoreszenzaufnahme eines Hippocampusschnittes nach Beladung mit einem irreversiblen und fluoreszenzmarkierten DP IV-Inhibitor



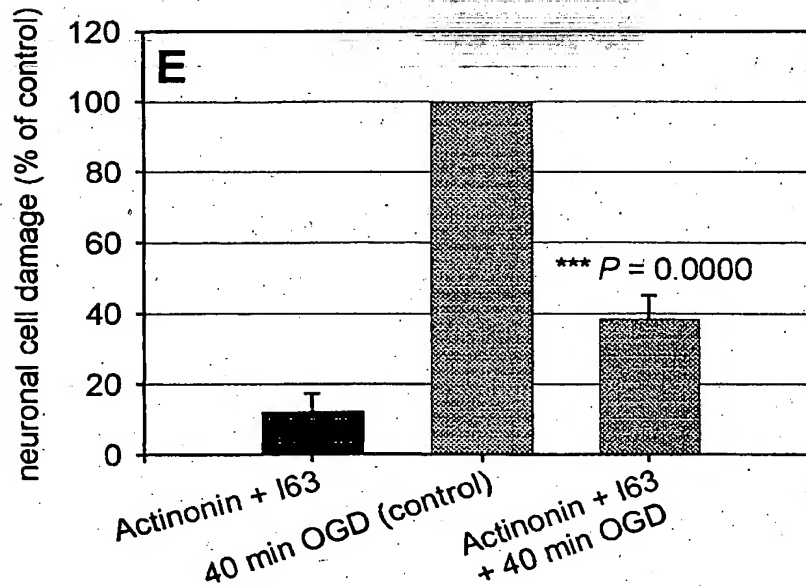
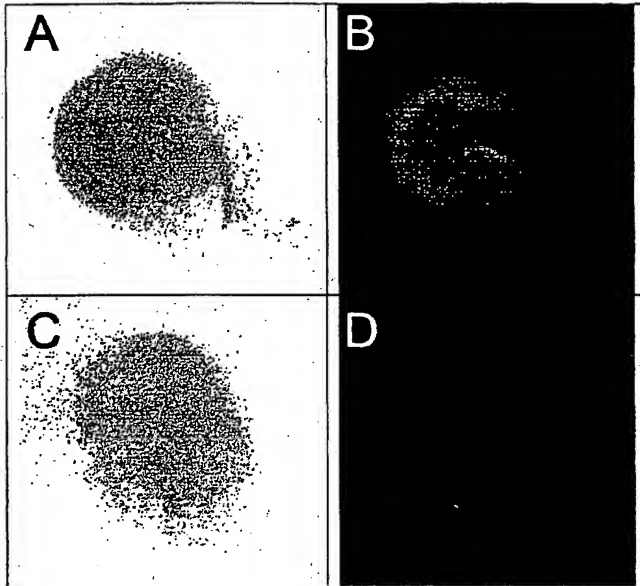
[0014] Hippocampusschnitte wurden mit einem I63/Fluoreszein-Konjugat ( $10 \mu\text{M}$ ) für 60 min inkubiert. Während dieser Zeit bindet I63-Fluoreszein irreversibel an DP IV, wodurch dieses Enzym fluoreszenzmarkiert wird. Anschließend wurden die Schnitte  $3\times$  für 20 min mit Phosphatpuffer gewaschen, um nicht gebundenen Inhibitor (inklusive Fluoreszenz) zu entfernen. DP IV-positive Neurone waren anschließend in allen CA Regionen des Hippocampus sowie in der Area dentata zu erkennen. Abbildung A zeigt DP IV-Markierung in der CA1, CA2 und CA3 Region eines hippocampalen Schnittes. In Abbildung B sind DP IV-positive Pyramidenzellen innerhalb der CA1 Region dargestellt. Beide Fluoreszenzbilder wurden mit einem konfokalen Laserscanmikroskop (Zeiss LSM 510, Objektive  $10\times$  (A) oder  $20\times$  (B)) aufgenommen.

## Beispiel 2

Neuroprotektive Wirkung gegen experimentelle Ischämie durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP-IV und der APN

Abb. 2

Protektiver Effekt von Inhibitoren der DP IV (I63) und der APN (Actinonin) auf das Überleben hippocampaler Neurone nach transientem Sauerstoff- und Glucoseentzug



[0015] Abgebildet sind die Transmissions- (links) und Fluoreszenzaufnahmen (rechts) von Hippocampuschnitten 24 h nach experimenteller Ischämie. Die Intensität der roten Fluoreszenz entspricht der neuronalen Zellschädigung (B, D). Die in Abb. 2A und 2B dargestellten Schnitte wurden einem 40 minütigen Sauerstoff und Glucoseentzug in der Abwesenheit von DP IV- oder APN-Inhibitoren ausgesetzt. Dagegen wurden die in Abb. 2C und 2D dargestellten Schnitte 24 h vor, während und 24 h nach der Ischämie mit I63 (1  $\mu$ M, DP IV-Inhibitor) und Actinonin (10  $\mu$ M, APN-Inhibitor) inkubiert. Die Auswertung von  $n = 8$  Experimenten mit jeweils mindestens 10 Schnitten/Kondition ist in Abb. 2E gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Der protektive Effekt bei gleichzeitiger Applikation von I63 und Actinonin ist signifikant ( $P = 0,0000$ , berechnet mittels zweiseitigem, heteroskedastischem t-Test) und beträgt etwa 62%.

[0016] Organotypische Hippocampuschnitte wurden entsprechend Striggow F et al. [Striggow F, Riek M, Breder J, Henrich-Noack P, Reymann KG, Reiser G (2000) The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 97: 2264–2269] präpariert und kultiviert. Nach 12 Tagen in Kultur wurde eine cerebrale Ischämie experimentell durch einen 40 minütigen Sauerstoff und Glucoseentzug simuliert. Dazu wurde vorübergehend Glucose

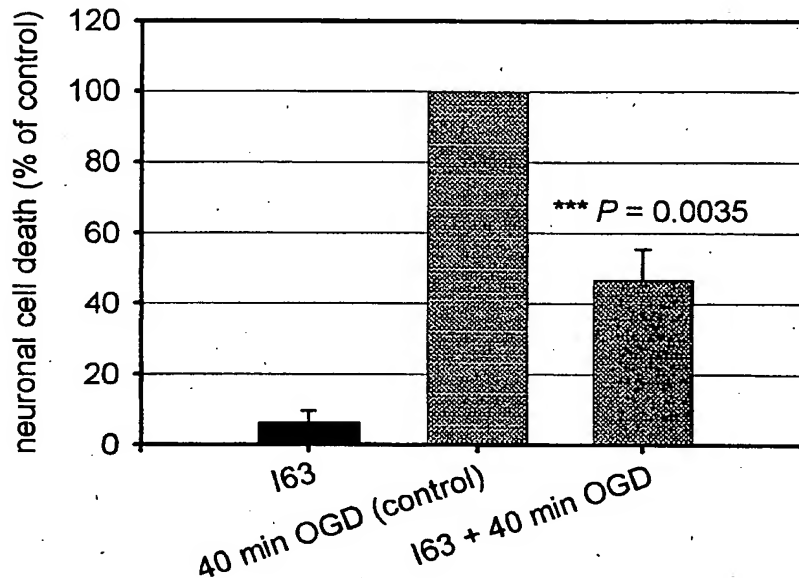
(10 mM) im Medium durch Mannitol (10 mM) ersetzt sowie mit 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> statt mit 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> begast. Nach weiteren 24 h unter normalen Kulturbedingungen wurden alle Schnitte für 1 h mit Propidiumjodid (PI) inkubiert. PI dringt nur in solche Zellen ein, deren Zellmembran geschädigt ist [Macklis JD, Madison RD (1990) Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. J. Neurosci. Methods 31: 43–46]. Erst dann kommt es zur charakteristischen roten Fluoreszenz, deren Intensität sich proportional zur neuronalen Zellschädigung verhält. Die Fluoreszenzbilder wurde mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskopes (Nikon Diaphot, 4x Objektiv) und einer CCD Kamera (Visitron Systems) aufgenommen und anschließend ausgewertet (Nikon, Lucia M Software-Paket).

## Beispiel 3

Protektiver Effekt eines DP IV-Inhibitors in der Abwesenheit von Hemmstoffen der APN

Abb. 3

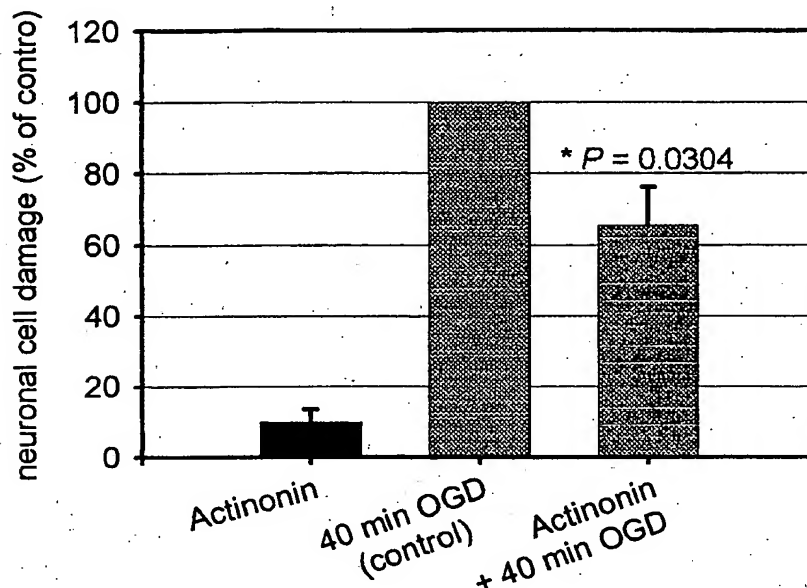
Effekt von Inhibitoren der DP IV (I63) auf das Überleben hippocampaler Neurone nach transientem Sauerstoff und Glucoseentzug



[0017] Die Experimente wurden wie in Abb. 2 beschrieben durchgeführt, mit der einzigen Ausnahme, daß ausschließlich I63 (1  $\mu$ M, DP IV-Inhibitor) 24 h vor, während und 24 h nach der Ischämie appliziert wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM ermittelt aus  $n = 4$  Experimenten. Der protektive Effekt ist signifikant ( $P = 0,0035$ , berechnet mittels zweiseitigem, heteroskedastischem t-Test) und beträgt etwa 53%.

Abb. 4

Wirkung von APN-Inhibitoren (Actinonin) auf das Überleben hippocampaler Neurone nach transienter experimenteller Ischämie



[0018] Die Experimente wurden wie in Abb. 2 beschrieben durchgeführt, mit der einzigen Ausnahme, daß ausschließlich Actinonin (10  $\mu$ M, APN-Inhibitor) 24 h vor, während und 24 h nach der Ischämie in das Medium gegeben wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM aus  $n = 5$  Experimenten. Der protektive Effekt ist signifikant ( $P = 0,0304$ , berechnet mittels zweiseitigem, heteroskedastischem t-Test) und beträgt etwa 34%.

#### Patentansprüche

1. Verwendung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von Enzymen mit gleicher bzw. ähnlicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) separat oder in jeglicher Kombination mit Inhibitoren der Alanyl-Amino-peptidase (Amino-peptidase N, APN) bzw. Enzymen gleicher bzw. ähnlicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität) zur Prävention und Therapie Ischämie-induzierter Schädigungen im zentralen Nervensystem, unabhängig davon, ob es sich um akute oder chronische Prozesse und unabhängig davon, ob es sich um Anwendungen am Menschen oder am Tier handelt.
2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Inhibitoren der DP IV bevorzugt Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa =  $\alpha$ -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat), entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester, Dipeptidboronsäuren (z. B. Proboro-Pro) und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)n-Peptide (Xaa =  $\alpha$ -Aminosäure,  $n = 0-10$ ), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze sind, wobei Xaa eine  $\alpha$ -Aminosäure bzw. ein seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise  $N^{\epsilon}$ -4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z. B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren.
3. Verwendung nach Anspruch 1, worin Aminosäureamide, z. B.  $N^{\epsilon}$ -4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin-thiazolidid, -pyrrolidid und -piperidid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperididderivat bevorzugt als DP IV-Inhibitoren eingesetzt werden.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei als Inhibitoren der APN bevorzugt Actinonin, Bestatin, Leuhistin, Phebestin, Amastatin, Probestin,  $\beta$ -Aminothiole,  $\alpha$ -Aminophosphinsäuren,  $\alpha$ -Aminophosphinsäurederivate, vorzugsweise D-Phe-y[PO(OH)-CH<sub>2</sub>]-Phe-Phe und deren Salze fungieren.
5. Verwendung von Inhibitoren oder Inhibitorkombinationen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Vorbeugung und Therapie von Ischämie-bedingten cerebralen Schädigungen, vorzugsweise nach ischämischem oder hämorrhagischem Schlaganfall, nach Schädel/Hirn-Trauma, nach Herzstillstand, nach Herzinfarkt oder als Folge von herzchirurgischen Eingriffen (z. B. Bypassoperationen).
6. Pharmazeutische Zubereitungen, umfassend Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) oder DP IV-analoge Enzymaktivität in Kombination mit Inhibitoren eines der Enzyme Alanyl-Amino-peptidase (Amino-peptidase N, APN) bzw. Enzyme gleicher bzw. ähnlicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität) und in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Zusatz- und/oder Hilfsstoffen.
7. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 6, umfassend als Inhibitoren der DP IV bevorzugt Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa =  $\alpha$ -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat), entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)n-Peptide (Xaa =  $\alpha$ -Aminosäuren,  $n =$

0-10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine  $\alpha$ -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise N<sup>ε</sup>-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z. B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren.

8. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 6, umfassend als Inhibitoren der DP IV vorzugsweise Aminosäureamide, z. B. N<sup>ε</sup>-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin-thiazolidid, -pyrrolidid und -piperidid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperididderivat.

9. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 6 umfassend als Inhibitoren der APN, vorzugsweise Actinoin, Leuhistin, Phebestin, Amastin, Probestin,  $\beta$ -Aminothirole,  $\alpha$ -Aminophosphinsäuren,  $\alpha$ -Aminophosphinsäurederivate, bevorzugt D-Phe-y[PO(OH)-CH<sub>2</sub>]-Phe-Phe und deren Salze als APN-Inhibitoren fungieren.

10. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 bis 9, umfassend zwei oder mehrere der Inhibitoren der DP IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität, der APN bzw. APN-analoger Enzymaktivität in räumlich getrennter Formulierung in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen zur gleichzeitigen oder zeitlich unmittelbar aufeinanderfolgenden Verabreichung mit dem Ziel einer gemeinsamen Wirkung.

11. Pharmazeutische Zubereitung gemäß Ansprüche 6 bis 10 für die systemische Anwendung zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären, rektalen, vaginalen, sublingualen Applikation zusammen mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen.

12. Pharmazeutische Zubereitung gemäß Ansprüche 6 bis 10 für die topische Anwendung in Form von z. B. Cremes, Salben, Pasten, Gele, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln, einschließlich instillativer Applikation.